

Структура, синтез и иммуномодулирующая активность бактериальных липопептидов и их аналогов

М.П.Усанова, Ю.Л.Себякин

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В.Ломоносова
117571 Москва, просп. Вернадского, 86, факс (095)430–7983

Рассмотрены современное состояние и перспективы использования природных липопептидов и их синтетических аналогов для изучения тонких механизмов функционирования сложноорганизованных биологических систем и решения различных задач биохимии и медицины. Суммированы результаты исследований, посвященных синтезу и биологической активности липопептидов. Обсуждены данные о применении липопептидов в качестве компонентов синтетических вакцин и противоопухолевых препаратов.

Библиография — 71 ссылка.

Оглавление

I. Введение	985
II. Строение клеточной стенки бактерий	985
III. Липопептидный состав клеточной стенки бактерий	986
IV. Влияние липопептидов на развитие ранних стадий иммунного ответа	987
V. Липопептиды-1	987
VI. Липопептиды-2	990
VII. Возможные области применения липопептидов-2	993
VIII. Применение липопептидов-2 в борьбе с вирусом иммунодефицита человека	994
IX. Противоопухолевая активность липопептидов-2	995
X. Заключение	995

I. Введение

Липопептиды — соединения, имеющие в своем составе пептидную цепь, с которой ковалентно связаны остатки одной или нескольких жирных кислот. Молекулы известных липопептидов содержат от четырех до шестнадцати аминокислотных остатков.¹ Природные липопептиды обнаружены, главным образом, в грамотрицательных бактериях и актиномицетах, но найдены также и у некоторых видов низших грибов. Для большинства липопептидов характерна строгая структурная специфичность по отношению к организму-продуценту.

Поиск методов борьбы с бактериальными инфекциями побудил исследователей к изучению строения различных бактерий. Так в 70-х годах начали проводиться систематические исследования клеточной стенки микобактерий.^{2–4} В ходе работ^{4,5} было установлено, что в состав фракции, обладающей наибольшей биологической активностью, входят фрагменты пептидогликанов, минимальной структурной единицей которых является *N*-ацетилмурамил-*L*-аланил-*D*-

изоглутамин (мурамилдипептид, MDP). В дальнейшем многие исследовательские группы занимались изучением фрагментов природных пептидогликанов и их синтетических производных.^{6–9}

В результате исследований было найдено, что биологической активностью обладают также бактериальные липопро-теины и фрагменты липопро-теинов — липопептиды. После установления иммуностимулирующей и противоопухолевой активности бактериальных липопептидов были предприняты многочисленные попытки синтеза их аналогов. Однако получение синтетических липопептидов сопряжено с определенными трудностями. Это связано с наличием в структуре липопептидов алифатической и пептидной части, а также с необходимостью получения оптически чистых соединений.

Параллельно с разработкой подходов к синтезу аналогов бактериальных липопептидов проводилось изучение их биологической активности. Было установлено, что синтетические аналоги также обладают иммуностимулирующими свойствами и могут проявлять ярко выраженную противоопухолевую активность. Благодаря этим свойствам липопептиды привлекают пристальное внимание исследователей в качестве потенциальных компонентов синтетических вакцин и противоопухолевых препаратов.

II. Строение клеточной стенки бактерий

Опорный скелет бактериальной стенки состоит в значительной степени из однородного полимера — пептидогликана (муреина). Пептидогликан — гетерополимер, построенный из цепочек, в которых чередуются остатки *N*-ацетил-*D*-глюкозамина и *N*-ацетилмурамовой кислоты [3-*O*-(1-кар-

М.П.Усанова. Магистр техники и технологии МГТХТ.

Телефон (095)437–6031.

Область научных интересов: биохимия, биологически активные соединения.

Ю.Л.Себякин. Кандидат химических наук, доцент того же института.

Телефон (095)437–1925.

Область научных интересов: химия биологически активных соединений.

Дата поступления 4 декабря 1996 г.

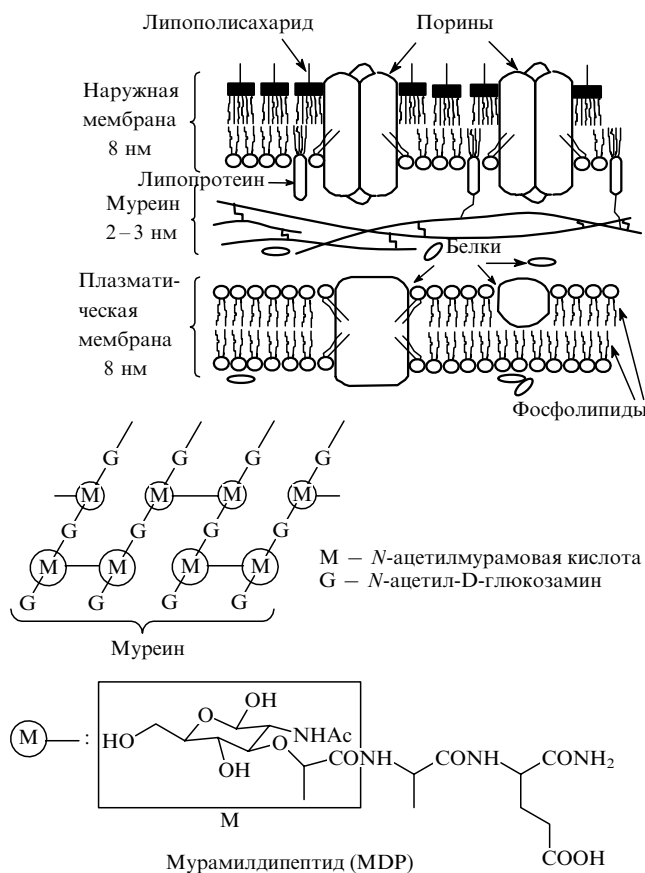


Рис. 1. Модель строения клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Структура муреина.¹¹

бокситил-N-ацетил-D-глюкозамина)], соединенные между собой β-1,4-гликозидными связями.¹⁰

Такие неразветвленные цепи гетерополисахарида мурамидина образуют основу муреина. Остатки мурамидовой кислоты через карбоксильные группы молочной кислоты соединены пептидной связью с аминокислотами. К типичным аминокислотам муреина относятся L-аланин, D-глутаминовая кислота, мезо-диаминопимелиновая кислота (для грамотрицательных бактерий) или L-лизин (для грамположительных бактерий) и D-аланин. Пептидными мостиками гетерополимерные цепи связаны между собой в мешкообразную гигантскую молекулу — муреиновый мешок, который выполняет функцию опорного каркаса клеточной стенки.¹⁰

У грамотрицательных бактерий муреиновая сеть является однослойной и составляет менее 10% сухой массы клеточной стенки (у *E. coli*). Муреин содержит только мезо-диаминопимелиновую кислоту и не содержит лизина; межпептидные мостики отсутствуют. Строение муреинового мешка (рис. 1) у всех грамотрицательных бактерий одинаково.

Поверх однослойного муреинового мешка располагается наружный слой клеточной стенки — наружная мембрана. На ультратонких срезах бактерий он сходен по виду с плазматической мембраной. Наружная мембрана состоит из белков, фосфолипидов и липополисахаридов (см. рис. 1), она плотно прилегает к муреиновому слою и связана с ним липопротеинами. Липопротеины ковалентно присоединены к слоям муреина (по-видимому, через диаминопимелиновую кислоту) и ориентированы липофильными концами наружу. Таким образом липопротеины оказываются закрепленными в липофильном двойном слое (благодаря гидрофобному взаимодействию). В этом слое находятся также фосфолипиды и гидрофобные концы липополисахаридов (липид А);

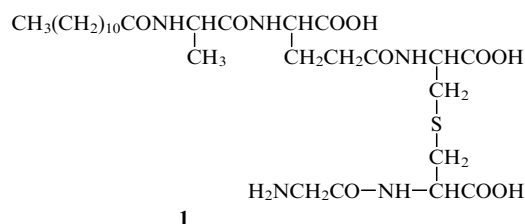
гидрофильные же концы последних (О-специфические гетерополисахаридные боковые цепи) обращены наружу.¹⁰

Благодаря способности активно стимулировать иммунный ответ, такие компоненты бактериальных мембран, как муреин, липополисахариды и липопротеины, привлекают к себе пристальное внимание ученых.

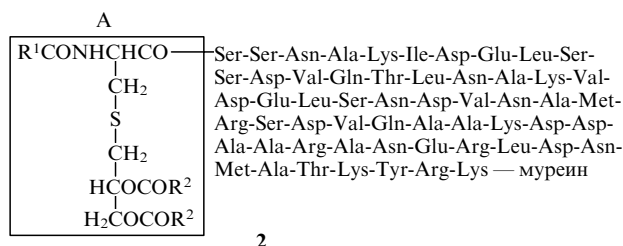
III. Липопептидный состав клеточной стенки бактерий

В отличие от пептидогликанов, у которых основным элементом, ответственным за биологическую активность, является мурамилдипептид, липопептиды разнородны по своему составу и биологическим функциям. Можно выделить три группы липопептидов.

К первой группе относятся соединения, пептидная составляющая которых включает в себя аминокислоты муреина и, прежде всего, D-глутаминовую кислоту в качестве основного структурного элемента. Такой аминокислотный состав и последовательность аминокислот и определяют, главным образом, иммуномодулирующую активность липопептидов-1 (LP-1). В качестве липидного компонента в LP-1 выступают, как правило, жирные кислоты, которые продлевают «время жизни» соединения в организме и способствуют его попаданию в липофильные компартменты.¹¹ Типичным представителем липопептидов первой группы является лаурил-L-аланил-γ-D-глутамил-N(6)-глициллантанионин (1).



Ко второй группе относятся липопептиды, являющиеся фрагментами липопротеина, выделенного из *E. coli*. Данный липопротеин является компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Он состоит из 58 аминокислотных остатков и продуцируется как секреторный предшественник с сигнальным пептидом, находящимся на N-конце. Этот липопротеин подробно описан.¹² Он проявляет митогенную активность в высших организмах, а также стимулирует образование клонов В-лимфоцитов в культурах мышей. В работе¹² определен аминокислотный состав липопротеина 2.



R¹, R² — насыщенный и ненасыщенный алкил

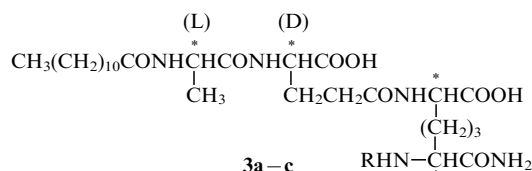
Основным элементом липопептидов, относящихся ко второй группе, является фрагмент, состоящий из L-цистеина и трех жирнокислотных остатков (А-фрагмент соединения 2). Благодаря наличию такой структурной единицы, липопептиды, отнесенные ко второй группе (LP-2), легко встраиваются в биологические мембраны. Аминокислотный состав LP-2, в отличие от аминокислотного состава LP-1, может широко варьироваться. Для липопептидов второй группы характерен более широкий спектр биологической активности.¹¹

ному остатку образуются соединения, также обладающие биологической активностью. Продемонстрировано,¹⁸ что в результате химического связывания лауриновой кислоты и биологически неактивного тетрапептида L-аланил-γ-D-глутамил-N(6)-глицил-L,L-2,6-диаминопимелиновой кислоты (выделен из неочищенного экстракта штамма *Streptomyces*) образуется соединение, обладающее иммуностимулирующей активностью *in vitro* и *in vivo*.^{18–20}

Впоследствии был осуществлен полный химический синтез лауроилтетрапептида **3a,b** (одно из принятых названий — пимелаутид) и изучены его биологические свойства.^{20, 21}

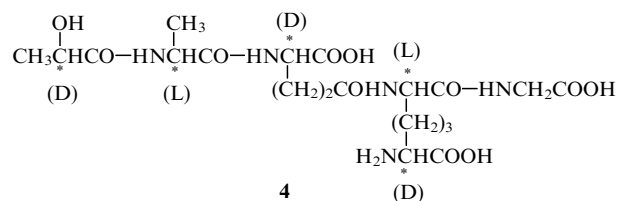
Эксперименты, проведенные с синтетическими изомерами лауроилтетрапептида **3a,b**, содержащими либо L,L-диаминопимелиновую кислоту (**3a**), либо ее D,D-изомер (**3b**), показали, что только соединение **3a** биологически активно *in vivo*.²²

Более того, оказалось, что лауроилтрипептид **3c** является таким же активным, как соединение **3a**. Оба соединения стимулируют производство интерлейкина-1 макрофагами и вызывают освобождение CSF-факторов в крови мышей в дозах, достаточных для защиты подопытных животных от бактериальной инфекции.²³



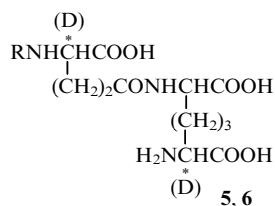
a: R = H₂NCH₂CO (L,L); **b:** R = H₂NCH₂CO (D,D); **c:** R = H (L,L).

Эти и другие свойства липопептидов нашли подтверждение в экспериментах, проведенных другими исследователями.²⁴ Было установлено,²⁴ что диаминопимелиновая кислота может быть замещена лантионином **1** без уменьшения активности и что липодипептиды, такие как пальмитоил-L-аланил-D-глутаминовая кислота или бегеноил-L-аланил-D-глутаминовая кислота, все еще сохраняют иммуностимулирующую активность *in vivo*. Сообщалось²⁵ о иммуностимулирующей активности D-лактоил-L-аланил-γ-D-глутаил-L-мезо-2,6-диаминопимелоилглицина (**4**), который является метаболитом *Streptomyces olivaceogriseus*.



4

Обнаружение биологической активности соединения **4** стимулировало синтез и изучение биологической активности множества его аналогов.^{26–28} Ниже приведена схема синтеза (схема 1) октаоил- (**5**) и стеароилпроизводных (**6**), также проявляющих биологическую активность.²⁶



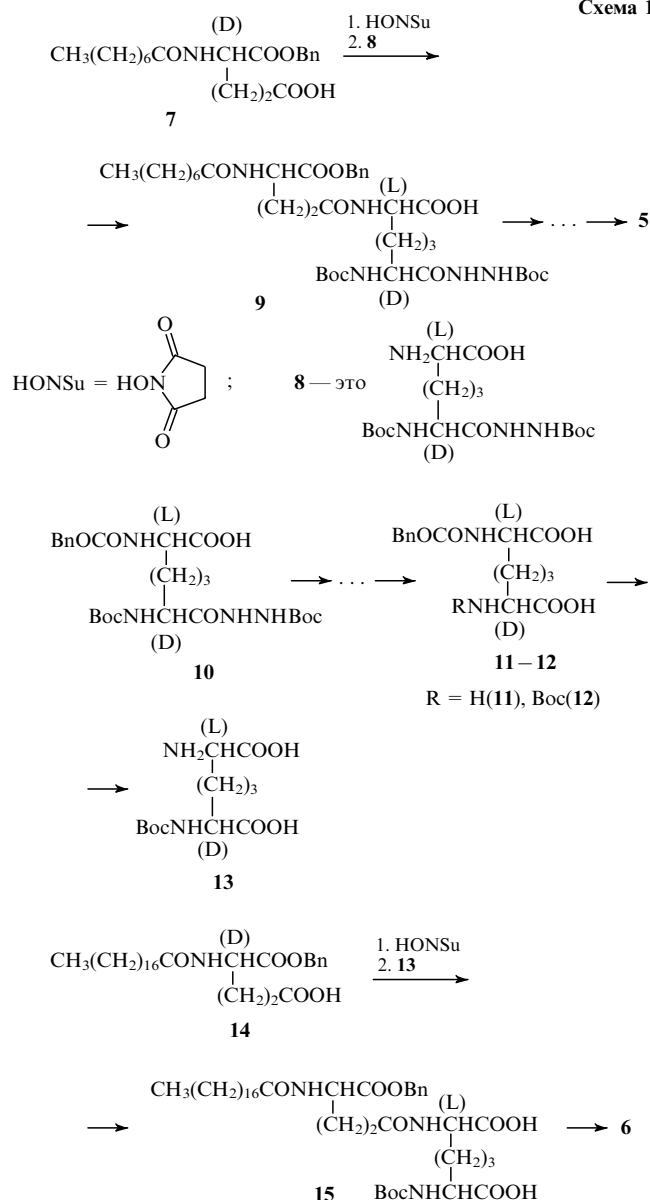
5, 6

5: R = CH₃(CH₂)₆CO;

6: R = CH₃(CH₂)₁₆CO.

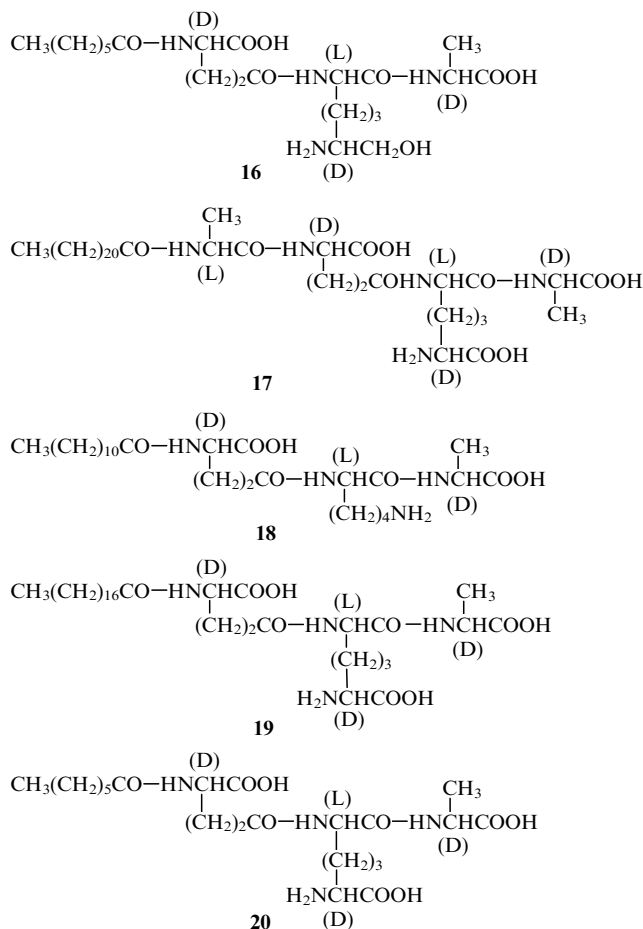
Ацилирование α-бензил-D-глутамата октаоилхлоридом давало α-бензил-N-октаоил-D-глутамат (**7**), который превращали в N-гидроксисукцинимидный эфир и присоединяли к NH₂CH(COOH)CH₂(CH₂)₂CH(NHBoc)CONHNHBoc (**8**).

Схема 1



Удаление защитных групп в полученном соединении **9** с помощью гидрогенолиза и обработки трифторуксусной кислотой с последующим окислением метапериодатом натрия приводило к октаоилпроизводному **5**. Данный метод не позволял получить стеароилпроизводное **6** из-за недостаточной растворимости промежуточных продуктов в реакциях удаления защитных группировок. Эта проблема была решена следующим образом. Гидразидную группу в производном мезо-2,2'-диаминопимелиновой кислоты удаляли до введения остатка жирной кислоты. Для этой цели BnOCONHCH(COOH)CH₂(CH₂)₂CH(NHBoc)CONHNHBoc (**10**) обрабатывали трифторуксусной кислотой и окисляли метапериодатом натрия, получая соединение **11**. Введение *tert*-бутоксикарбонильной защитной группировки (Boc) в **11** давало соединение **12**. Последующий гидрогенолиз соединения **12** приводил к соединению **13**. α-Бензил-N-стеароил-D-глутамат **14**, полученный ацилированием α-бензил-D-глутамата стеароилхлоридом, переводили в N-гидроксисукцинимидный эфир, который присоединяли к соединению **13**, получая соединение **15**. Далее удалением защиты гидрогенолизом с последующей обработкой трифторуксусной кислотой получали конечный продукт **6**.

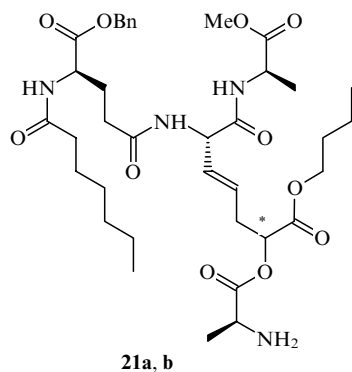
Аналогично были синтезированы соединения **16–20**.²⁷ Наиболее активным из них оказался липопептид **20**.



Результаты биологических исследований полученных синтетических аналогов липопептида **4** позволили установить, что γ -D-глутамил-мезо-диаминопимелиновая кислота является минимальной структурной единицей, ответственной за иммуностимулирующую активность этого ряда соединений.²⁸

Было высказано предположение,²⁸ что остаток диаминопимелиновой кислоты отвечает не только за биологическую активность, но и за токсические эффекты липопептида **20** и его производных, что мешает терапевтическому использованию этих соединений.

На основании данных молекулярного моделирования был осуществлен полный химический синтез стереоизомерных соединений **R-21** и **S-21** (схема 2).²⁹



21a, b

21a (*R*-изомер), **21b**(*S*-изомер).

В структуре этих соединений остаток диаминопимелиновой кислоты был заменен на остатки непредельных гидрок-

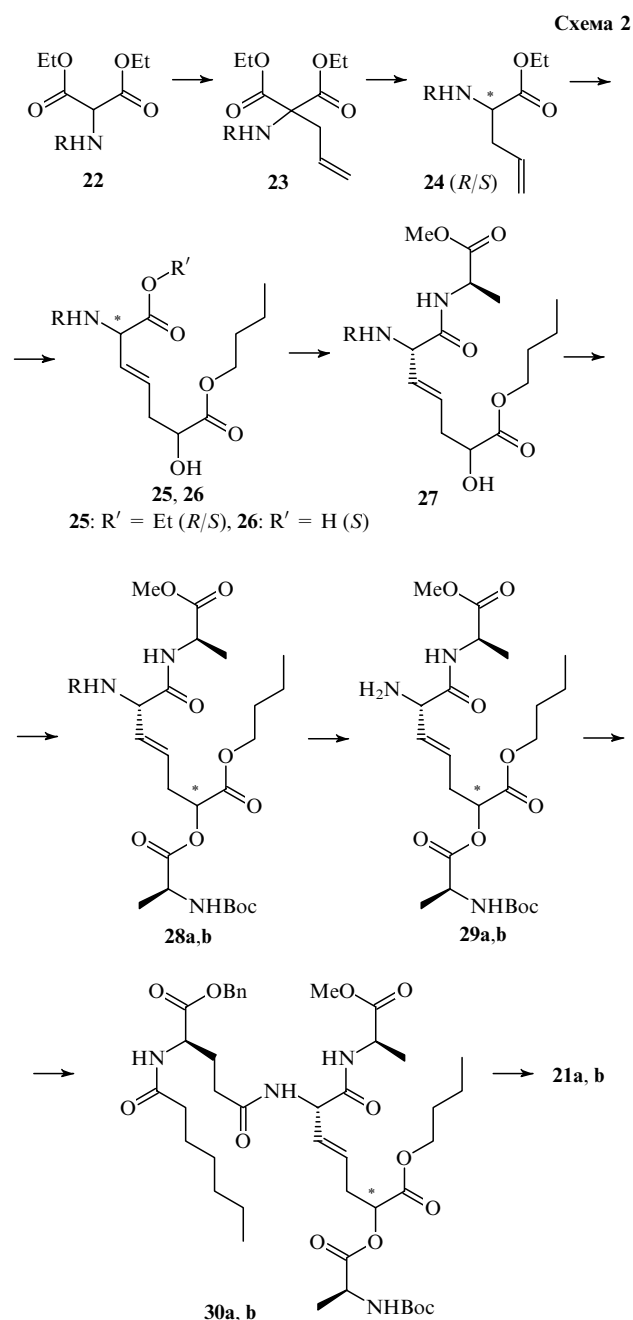


Схема 2

22–27: R = COOCH₂CCl₃;
a: *R*-изомер; **b:** *S*-изомер.

сиаминодикарбоновых кислот, гидроксильная группа которых этерифицирована остатком L-аланина.

Было изучено ²⁹ несколько путей синтеза соединений *R*- и *S*-21. В основе всех схем синтеза лежала реакция между эфиром глиоксиловой кислоты и *N*-защитной 2-аминопент-4-еновой кислотой, катализируемая сильными кислотами Льюиса. В качестве защитной группировки использовали 2,2,2-трихлорэтоксикарбонильную защиту, стабильную в присутствии сильных кислот Льюиса. Из всех рассмотренных схем синтеза наиболее оптимальной была признана схема 2. Ее преимущество заключалось в том, что она позволяла максимально исключить нежелательные побочные реакции и обеспечивала наиболее высокие выходы конечных продуктов.

Защищенный диэтиламинамалонат **22** обрабатывали аллилбромидом в EtOH/EtONa. Соединение **23**, переводили далее в рацемическое производное **24**. Обработка соединения

24 бутиловым эфиром глиоксиловой кислоты приводила к смеси диастереомеров **25**. Далее соединение **25** стереоспецифично гидролизвали с помощью α -химотрипсина. Полученную в результате гидролиза *S*-кислоту **26** присоединяли к метиловому эфиру D-аланина, что приводило к смеси диастереомеров **27**. Из смеси диастереомеров **27** в присутствии дициклогексилкарбодиимида (DCC) и метилового эфира аминопропионовой кислоты (DMAP) синтезировали смесь диастереомеров **28a,b**, легко разделяемых кристаллизацией или хроматографией. После снятия трихлорэтоксикарбонильной защиты с аминогруппы при pH 4 и 25°C соответствующие амины **29a,b** были присоединены к γ -карбоксильной группе α -бензил-*N*-гептаноил-D-глутамата, предварительно активированного с помощью изобутилхлорформата. Полученные в результате конденсации Вос-защищенные липопептиды **30a,b**, после снятия защиты с помощью трифторуксусной кислоты и обработки соляной кислотой в эфире, были превращены в целевые соединения **21a,b** в виде гидрохлоридов.

Соединение **21a** индуцировало высокие титры CSF, не проявляя при этом токсичности.³⁰ К сожалению, активность сильно уменьшалась во времени из-за быстрого процесса метаболизма данного соединения после орального применения.

Дегградация гидрохлорида **21c** приводит в основном к иммунонеактивному соединению **32**, наряду с которым образуется небольшое количество гидроксисоединения **31**, еще проявляющего иммуностимулирующую активность (схема 3).

Чтобы избежать быстрого метаболического процесса, присущего соединению **21**, был осуществлен синтез³⁰ его аналога, в структуре которого присутствует дополнительная метильная группа в α -положении остатка пимелиновой кислоты.

Рассмотренные выше липопептиды **3a**, **4**, **14–20** являются высокоактивными иммуностимуляторами. Первый представитель липопептидов, содержащих в своем составе аминокислоты муреина — лауроилтетрапептид **3a** — стимулирует *in vivo* фагоцитозную активность макрофагов у мышей и моноцитов крови человека, а также увеличивает активность ретикулоэндотелиальной системы у мышей.^{20,21} Применительно к мышам соединение **3a** вызывает индукцию цитотоксических лимфоцитов против аллогенических опухолевых клеток и стимулирует активность NK-клеток селезенки и периферической крови.

Данные виды активности показывают, что лауроилтетрапептид способен взаимодействовать (прямо или косвенно) с клетками системы фагоцитоза, Т-лимфоцитами и NK-клетками. Также было показано, что *in vitro* лауроилтетрапептид стимулирует хелперную активность лимфоцитов крови человека в процессе дифференциации В-лимфоцитов в плазмацинты.

Лауроилтетрапептид оказывает адьювантный эффект на ДТН-реакции у мышей (гиперчувствительность замедленного типа), а также на производство антител против различных антигенов. В первом случае он более активен, чем MDP, а во втором — менее активен.

Лауроилтетрапептид **3a** вызывает у мышей сопротивляемость к различным инфекциям (*Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*). Кроме того он ингибирует развитие легочных метастаз у мышей, привитых внутривенно клетками меланомы B16 или подкожно клетками легочной карциномы Льюиса. Лауроилтетрапептид позволяет снизить оптимальную дозу соединений, проявляющих противораковую активность, например, циклофосфамида. Во всех системах *in vivo* лауроилтетрапептид **3a** проявлял активность при дозах в пределах 0.1–3 мг·кг⁻¹, в то время как его LD₅₀ у мышей при внутривенном применении составляет 410 мг·кг⁻¹.

Липопептид **20** и ряд других соединений усиливают сопротивляемость мышей с нормальной и ослабленной иммунной системой к бактериальным и грибковым инфекциям, а также повышают иммунотерапевтическую активность у мышей, привитых сингенными опухолевыми клетками.^{31,32} В настоящее время упомянутые выше соединения проходят клинические испытания. Предстоит определить их терапевтическую полезность, особенно в случаях, когда иммунная система пациента нуждается в укреплении.

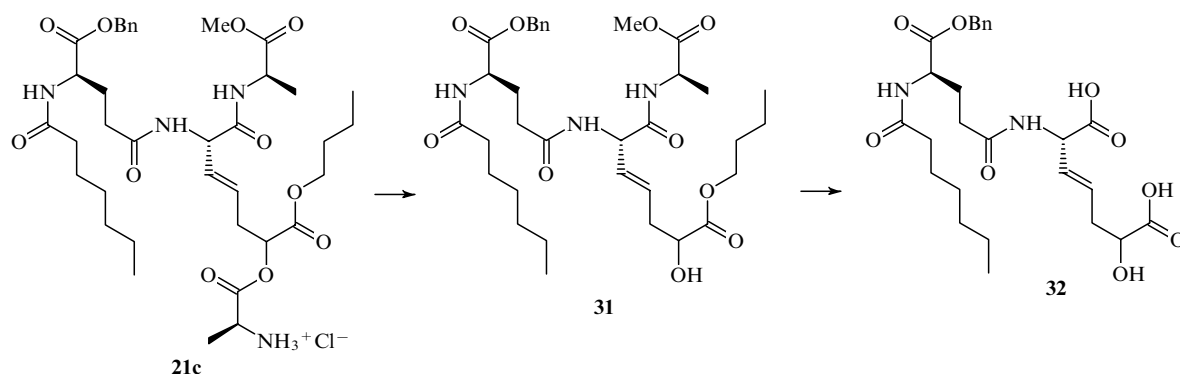
В силу проявляемой иммунной активности липопептиды могут не только оказывать защитное действие против бактериальной инфекции, но и влиять на различные процессы, например, на процесс метаболизма ксенобиотиков в печени, и таким образом защищать организм от токсического действия некоторых веществ.

Проведенные исследования³³ показали, что иммуномодулирующие лауроилпептиды оказались способны защитить мышей от токсичности, вызванной парацетамолом. Так, соединения **3a,c**, обладающие иммунной активностью, в тех же дозах проявляют активность против токсичности, вызванной парацетамолом (выживание более 80% мышей), и ведут *in vivo* к уменьшению испарения этана, которое используется в качестве индекса липидного окисления. Исследуемые липопептиды приводят также к уменьшению количества цитохрома P-450 в печени и снижению степени CCl₄-индуцированного липидного окисления. Механизм защитного действия можно объяснить присутствием факторов, секретируемых под действием липопептидов **3a,c**, таких как интерлейкин-1, подавляющих действие цитохрома P-450,³⁴ или других факторов, секретируемых макрофагами³⁵ или клетками Купффера.³⁶

VI. Липопептиды-2

При исследовании биологической активности компонентов бактериальных мембран было установлено, что природные липопротенины (в частности, липопротейн, выделенный из

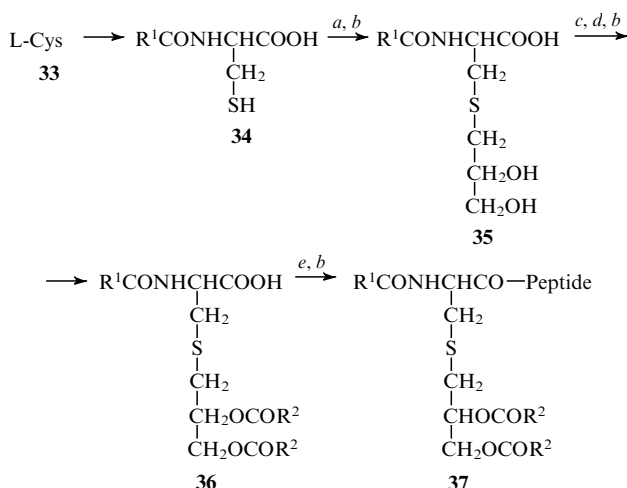
Схема 3



E. coli, и его фрагменты) наряду с бактериальным полисахаридом и мурамилдипептидом проявляют митогенную активность и стимулируют клетки, индуцирующие увеличение выброса интерлейкина-1 и производство простагландинов E_2 и $F_{2\alpha}$ и интерферона.^{37–39} Кроме того, мембранные липопротеины являются мощными активаторами поликлональных В-лимфоцитов.

Синтетические липопептиды — аналоги природных — также обладают иммуностимулирующей активностью. Синтезированы N-терминальные липопептиды липопротеина из внешней мембраны *E. coli*, в частности, трипальмитоил-S-глицерил-L-Cys-Ser (Pam₃Cys-Ser) и его аналоги с более длинными последовательностями,⁴⁰ которые стимулируют образование клонов В-лимфоцитов⁴¹ (схемы 4 и 5).

Схема 4



34–37: $R^1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}$;

36, 37: $R^2 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{23}$.

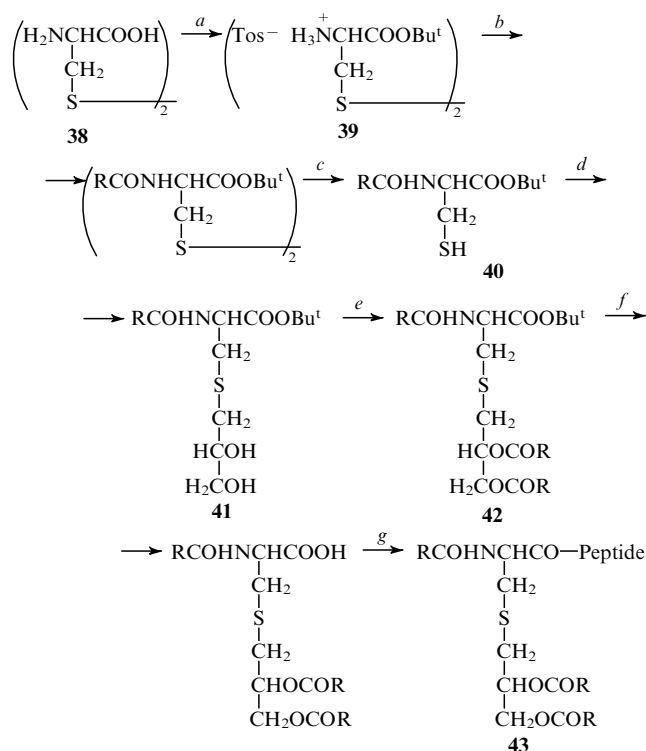
a) 1,2-О-изопропилиден-3-О-тозил-*sn*-глицерин, K_2CO_3 , EtOH;
b) H_3O^+ ; c) Ph_2CN_2 ; d) R^2COCl , Py; e) DCC, *N*-гидроксинорборнандикарбоксимид, C-защищенный пептид.

Первой стадией синтеза аналогов липопротеина, выделенного из *E. coli*, по схеме 4 является получение ряда *N*-ацилцистеинов из исходного L-цистеина (33). Так, L-цистеин сначала превращают в *N*-бегеноил-L-цистеин (34), затем алкилированием меркаптогруппы цистеина 34 с помощью 1,2-О-изопропилиден-3-О-тозил-*sn*-глицерина и кислотным гидролизом переводят в *N*-бегеноил-S-(2*R*,2,3-дигидроксипропил)-L-цистеин (35). С помощью *R*,S-глицидола получают смесь *N*-бегеноил-S-(2*R*,S-2,3-дигидроксипропил)-L-цистеинов, вводят бензгидрильную защиту карбоксильной группы цистеина и ацилируют гидроксильные группы. После снятия бензгидрильной защиты кислотным гидролизом при pH 5 образуется соединение 36.

Стадия *e* нуждается в специальном комментарии. Обычный синтез пептидной связи с помощью дициклогексилкарбодиимида и *N*-гидроксibenзотриазола приводит в данном случае к почти полной рацемизации. Использование вместо *N*-гидроксibenзотриазола *N*-гидроксинорборнандикарбоксимида позволило получить соединение 37, которое содержало менее трех процентов *S*,*R*-диастереомера.¹¹

Первой стадией в синтезе липопротеинов по схеме 5 является получение эфира 39 из исходного L-цистеина (38). Ацилирование аминогруппы соединения 39 пальмитоилхлоридом и последующее восстановление дисульфидной связи цинком в кислой среде приводит к *трет*-бутиловому эфиру *N*-пальмитоилцистеина (40). Соединение 40 алкилировали по меркаптогруппе с помощью 1-О-тозил-*sn*-глицерина, который реагирует быстрее чем 1,2-О-изопропилиден-3-О-тозил-*sn*-глицерин, и получали сульфид 41. Далее сульфид 41

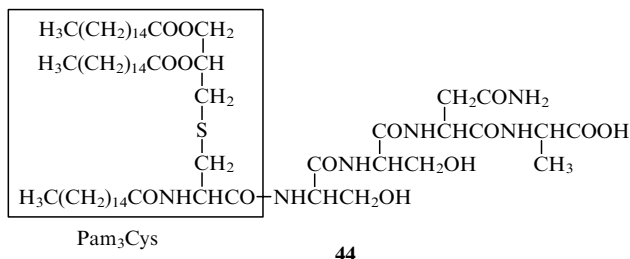
Схема 5



a) MeCOOBu^t , HClO_4 ; b) RCOCl , *N*-этилморфолин;
c) Zn, лимонная кислота; d) 1-О-тозилглицерин, DBU, DMF;
e) RCOCl , Py, 4-диметиламинопиридин, f) CF_3COOH ;
g) DCC, *N*-гидроксинорборнандикарбоксимид, пептид.

ацилировали пальмитоилхлоридом до соединения 42. После снятия *трет*-бутильной защиты с помощью трифторуксусной кислоты присоединяли пептидный фрагмент по освобожденной карбоксильной группе, получая конечный продукт 43.

В работах^{40,42–46} были изучены липопептидные монослои на примере синтетических липопептидов с различной длиной пептидной цепи, различным числом остатков жирных кислот и различными защитными группами. Для получения информации о взаимодействии этих соединений с типичной липидной мембраной монослои из липопептидов с тремя остатками жирных кислот были смешаны с дипальмитоилфосфатидилхолином и холестерином. (Использованные в данных работах синтетические липопептиды содержали только остаток пальмитиновой кислоты, в то время как в природном соединении найдена смесь различных высших жирных кислот.⁴⁷)

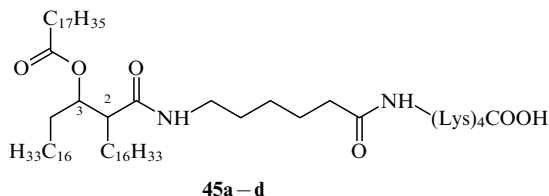


Было показано, что синтетический липопептид *N*-пальмитоил-S-[2*R*,S-2,3-дипальмитоилоксипропил]-L-цистеинил-D-серил-D-серил-D-аспарагинил-D-аланин (44) проявляет такие же митогенные свойства, как и природный липопротеин.^{45,46,48–50}

При укорачивании пептидной цепи, т. е. при переходе от пептапептида Pam₃Cys-Ser-Ser-Asn-Ala к дипептиду

Pam₃Cys-Ser, иммуностимулирующие свойства такого липодипептида все еще сохраняются, однако сам по себе трипальмитоил-*S*-глицерил-*L*-цистеин проявляет лишь слабый стимулирующий эффект.⁴¹ Липофильный полностью защищенный липопептид Pam₃Cys-Ser(Bu^t)OBu^t показал слабую митогенную активность. На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что для специфичности активационного процесса важную роль играют полярные головные группы, и, в частности, гидроксильная и карбоксильная группы серина. Благодаря этим свойствам описанные выше синтетические митогены являются наиболее подходящими соединениями для исследования ранних стадий иммунного ответа, для изоляции специфических связывающих протеинов и исследования взаимосвязи структуры с активностью.⁵¹

Перечисленные выше синтетические аналоги N-терминального липопептида, выделенного из *E. coli*, обладают одним существенным недостатком — они плохо растворяются в воде, что затрудняет их использование в качестве адъювантов. Чтобы решить проблему растворимости, был синтезирован липопептид трипальмитоил-*S*-глицерилцистеинил-серил-(лизил)₃-лизин (Pam₃Cys-Ser-Lys₄),⁵² который является водорастворимым и, как было доказано в ряде тестов, проявляет биологическую активность. Были синтезированы также производные 3-*O*-стеароилкоринномиколиновой кислоты (соединения **45a–d**).⁵³



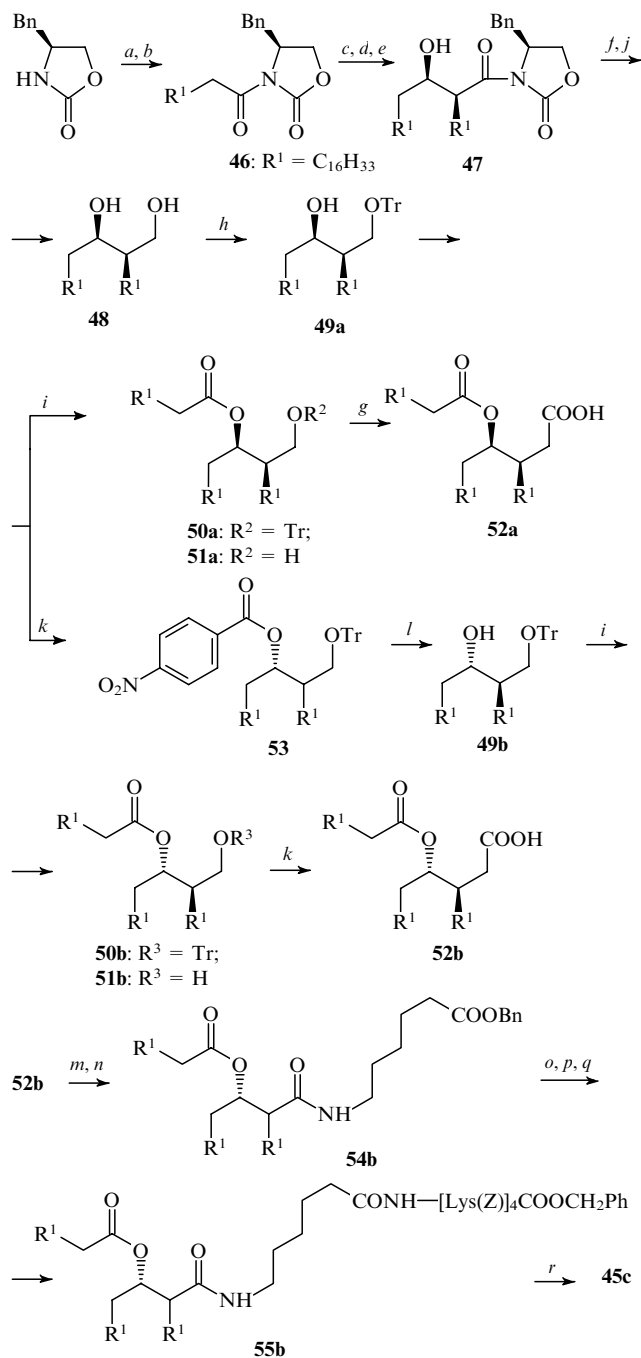
45a: 2*S*,3*R*-изомер, **45b:** 2*S*,3*S*-изомер,
45c: 2*R*,3*S*-изомер, **45d:** 2*R*,3*R*-изомер.

Основной проблемой при синтезе данных соединений была разработка методики, позволяющей получать все четыре стереоизомера. Авторами⁵³ была предложена схема синтеза данных соединений (схема 6).

S-*N*-Стеароил-2-оксазолидон (**46**) был получен после соответствующей обработки *S*-4-бензил-2-оксазолидона бутиллитием и стеароилхлоридом. Действием на соединение **46** 9-борабицикло[3.3.1]нонилтрифторметансульфоната (9-BBN-OTf) и конденсацией продукта реакции с октадеканалем было получено соединение **47**, которое далее превращали в диол **48** обработкой LiBH₄ во влажном эфире. Введение тритильной защиты по первичной гидроксильной группе и ацилирование вторичной гидроксильной группы в диоле **48** стеароилхлоридом давало соединение **50a**. Снятие тритильной защиты с образованием **51a** осложнялось внутримолекулярной ацильной миграцией. Однако последующее окисление смеси изомеров приводило к кислоте **52a**.

Чтобы получить кислоту **52b**, проводили инверсию стереохимии при атоме C-3 в соединении **49a**. Последнее взаимодействием с *n*- или *o*-нитробензойной кислотой в присутствии PPh₃ и диэтилазодикарбоксилата (DEAD) было превращено в соединение **53**. Расщепление сложноэфирной связи требовало жестких условий (стадия *l*) и приводило к соединению **49b**, которое затем превращали в кислоту **52b** (аналогично **49a** → **52a**). Та же последовательность реакций, начиная с *R*-4-бензил-2-оксазолидона, приводила к соединениям — энантиомерам соединений **46**, **47**, **48** и **53** — и конечным продуктам **52c** (2*R*,3*S*) и **52d** (2*R*,3*R*). Далее, используя метод активированных эфиров, к кислотам **52a–d** присоединяли пептидный фрагмент и получали липопептиды **45a–d** (стадии *m–r* на схеме 6).

Схема 6



R' = CH₃(CH₂)₁₅.

a) BuLi, THF, –78°C; b) C₁₇H₃₅COCl, –78°C; c) 9-BBN-OTf, Pr₂NH, CH₂Cl₂, 0°C; d) C₁₇H₃₅CHO, –78°C; e) MeOH, 30%-ный H₂O₂, буфер pH 7.0, 0°C; f) LiBH₄, эфир; j) NH₄Cl, 0°C; h) Ph₃CCl, C₅H₅N; i) C₁₇H₃₅COCl, C₅H₅N/CH₂Cl₂, 0°C; k) KMnO₄, C₆H₁₄/CH₃COOH/H₂O; g) DEAD, PPh₃, *p*-NO₂C₆H₄COOH, C₆H₆; l) 2 M MeONa в MeOH; m) DCC, HONSu; n) Cl[–]NH₃⁺(CH₂)₅COOCH₂Ph, Pr₂NH, DMF/CH₂Cl₂; o) 10% Pd/C, H₂, AcOEt; p) DCC, HONSu, CH₂Cl₂, 0°C; q) Cl[–]NH₃⁺[Lys(Z)]₄COOCH₂Ph, CH₂Cl₂; r) 10% Pd/C, H₂, THF/0.1 N HCl.

Данные липопептиды имеют четыре лизиновых остатка, что создает ряд трудностей из-за возникновения высоких положительных зарядов.

В работе⁵⁴ для увеличения растворимости липопептидов два липопептидных аналога липопептида, выделенного

из *E. coli*, а именно, Pam₃CysOH и Pam₃Cys-SerOH, связали с полиоксипропиленом 3000 (POE). Полученные конъюгаты не только хорошо растворялись в воде, но и не имели высоких положительных зарядов. Увеличение растворимости в воде не внесло изменений в биологические свойства липопептидной части. Авторы работы⁵⁴ пришли к выводу, что полиоксипропиленовая составляющая, сама по себе неактивная, повышает активность липопептидов, увеличивая процент липопептидных молекул, достигнувших клеток.

VII. Возможные области применения липопептидов-2

Природные липопептиды — фрагменты липопротеина, выделенного из мембраны *E. coli* — являются высоко эффективными стимуляторами производства антител и активаторами В-клеток. Синтетические липопептиды усиливают первичный и вторичный иммунный ответ к корпускулярным антигенам *in vitro* и *in vivo*.⁵⁵ Добавление синтетических липопептидных фрагментов к убитым ацетоном клеткам *Salmonella typhimurium* позволяет существенно снизить дозу этой вакцины. Предполагают, что первым звеном в механизме действия липопептидов является их взаимодействие с плазматической мембраной клетки путем включения липофильных групп в липидный бислой и связывание с мембранными белками. Таким образом митогенная активация клеток может быть достигнута в результате использования условий бессывороточной культуры и применения митогена, оптимально растворенного в детергентсодержащих растворах. При этом митогенная активность соединения **44** *in vitro* проявляется уже при концентрациях 10 нг·мл⁻¹. Оптимальная стимулирующая активность наблюдается при концентрациях ~ 30 нг·мл⁻¹.

В работе⁵⁶ исследовалась адъювантная активность трипальмитойлпентапептида на предмет иммунного ответа *in vitro*. Иммунный ответ против нативных эритроцитов овцы и эритроцитов овцы, обработанных нитрофенолом, сильно увеличивался при добавлении различных количеств трипальмитойлпентапептида **44** к культурам. Увеличение иммунного ответа зависело от дозы трипальмитойлпентапептида: оптимальный адъювантный эффект проявлялся при концентрациях от 10 до 30 нг·мл⁻¹.

Резко выраженный адъювантный эффект был получен только в тех случаях, когда трипальмитойлпентапептид и антиген действовали в одно и то же время. Добавление же липопептида за день до добавления антигена либо днем позже не вызывало эффекта. По-видимому, адъювантный эффект трипальмитойлпентапептида связан с образованием комплекса адъюванта с антигеном.

Использование липопептидов как адъювантов не ограничивается клеточными антигенами *in vitro*. Было показано, что иммунный ответ *in vivo* к нативным эритроцитам овцы и эритроцитам овцы, обработанным нитрофенолом, также заметно возрастал в присутствии липопептида, и что *in vivo* иммунный ответ к белкам, таким как овальбумин, может увеличиваться при добавлении липопептида.

Особый интерес вызвало исследование митогенной и адъювантной активности водорастворимых липопептидов, так как в случае высокой иммуностимулирующей активности эти соединения могли бы быть пригодны для коммерческого использования. В этой связи синтетические липопептиды Pam₃Cys-Ser-POE и Pam₃Cys-POE были протестированы на митогенность *in vitro* на примере человеческих В-лимфоцитов, а также на адъювантную активность *in vivo* на мышцах. Было установлено, что липопептид-полиоксипропиленовые конъюгаты проявляют такую же митогенную активность, как и водорастворимый катионный липопептид Pam₃Cys-Ser-Lys₄. Биологическая активность наблюдалась уже при концентрациях порядка 30 нг·мл⁻¹.

Чтобы исследовать возможную область использования липопептид-полиоксипропиленовых конъюгатов в качестве адъювантов при создании вакцин, адъювантная активность этих соединений была сопоставлена с активностью трех коммерчески доступных адъювантов: адъюванта Фрейнда, неионного блоксополимера Хантера⁵⁷ и вегетана, экстрагируемого из картофеля. В качестве антигенов использовали овальбумин и мелиттин (пептид, состоящий из 26 аминокислотных остатков, выделенный из пчелиного яда), приготовленный синтетическим путем. Было найдено, что липопептид-полиоксипропиленовые конъюгаты менее активны, чем Pam₃Cys-Ser-Lys₄ или адъювант Фрейнда, но они обладают такими же возможностями, что и блоксополимер Хантера или вегетан. У мышей, которым вводили антиген (мелиттин или овальбумин) и Pam₃Cys-Ser-POE или Pam₃Cys-POE, наблюдались сходные титры антител как против мелиттина, так и против овальбумина. Однако для максимального (сравнимого с получаемым при использовании адъюванта Фрейнда) ответа, требовалась повторная подымунизация. В большинстве случаев трех инъекций было достаточно.

При создании синтетических вакцин необходимо быть уверенным в безопасности использования поликлональных активаторов в качестве адъювантов для обычных иммунизаций. Исследуемые липопептиды не проявляли токсических или других неблагоприятных эффектов при испытаниях на животных, они вызывали недельный воспалительный процесс в месте инъекции с полным восстановлением пораженного участка в течение нескольких недель, тогда как у животных, на которых проводили исследования адъюванта Фрейнда, развивались длительные опухоли в местах инъекций.

На основании этих исследований авторы работы⁵⁴ сделали заключение, что новые полиоксипропиленовые соединения способны к поликлональной активации В-лимфоцитов человека в культуральных системах и проявляют достаточную адъювантную активность. Они могут быть легко синтезированы и дают стабильные растворы, кроме того, они не токсичны. По этой причине предполагается дальнейшее использование Pam₃Cys-Ser-POE и Pam₃Cys-POE в качестве адъювантов для иммунизации животных и, возможно, после соответствующих исследований, для иммунизации человека.

Синтетический митоген трипальмитойлпентапептид **44** и некоторые его аналоги могут неспецифично увеличивать сопротивление организма-хозяина к бактериальным инфекциям. Это свойство особенно часто используется в исследованиях, посвященных поиску новых эффективных антигенов при создании синтетических вакцин, когда в качестве антигена предполагается применять пептид, сам по себе малоиммуногенный, или фрагмент природного белка. Так как процедура ковалентного связывания пептида и липопептидного адъюванта приводит к усилению иммуногенности и легко осуществима, то данный способ можно использовать при изучении эпитопной специфичности различных природных белков. Примером подобного исследования является работа⁵⁸, посвященная поиску эффективных антигенов против *Haemophilus influenzae* (Hi).

Основной причиной заболевания новорожденных и детей эндемическим бактериальным менингитом является попадание в организм бактерий Hi типа b (Hib); нетипичная Hi также является важнейшим патогеном. Наиболее опасные бактериальные инфекции у человека — менингиты, артриты и т.д. — также вызваны Hib. Сыворотка антител против капсулярного полисахарида Hib защищает человека от заболеваний, вызванных Hi. Однако такой способ защиты не эффективен для детей до года, подверженных высочайшему риску подобных заболеваний. Эти факты стимулировали поиск новых антигенов.

Белок Р6 (16600 Da), присутствующий во внешней мембране двух типичных и одного нетипичного вида Ні, является важнейшим антигеном при создании иммунитета к Ні. Антигены к Р6 обладают защитным и бактерицидным действием. Предшественником Р6 является бактериальный липопро-теин, состоящий из 134 аминокислот и несущий на N-конце цепи жирные кислоты, связанные амидной и сложноэфирными связями с S-глицерилфосфатом. Так как структура такого липопroteина напоминает структуру липопroteина, найденного у *E. coli*, то в работе⁵⁸ были синтезированы липопептиды, в которых различные фрагменты аминокислотной последовательности Р6 были ковалентно связаны с N-пальмитоил-S-(2R,S-2,3-дипальмитоилоксипропил)-L-цистеинил-D-серином. Полученные данные свидетельствуют об эпитопной специфичности антител. Липопептиды, содержащие последовательность Gln-Ile-Leu-Asp-Ala-His-Ala-Ala (Р6 47-54), и эпитопы В-клеток мыши Gly-Glu-Tyr-Val (Р6 43-46) были способны вызывать Т-хелперную активность у мышей линии BALB/c. Антитела, образующиеся в результате иммунизации, эффективно нейтрализовали воздействие бактерий Ні. Таким образом, использование в качестве синтетических вакцин смеси липопептидов, содержащих перечисленные выше сегменты белка Р6, является высокоперспективным для экспериментов *in vivo* с инфекционными модельными системами.

Другой пример использования адъювантов, ковалентно связанных с антигенами, описан в работе⁵⁹. Процедура ковалентного связывания липопептидных адъювантов с антигенами особенно важна для соединений, которые сами по себе проявляют малую иммуногенную активность, так как в этом случае липопептиды усиливают иммуногенность антигенов в искусственных вакцинах.

Цитотоксические Т-лимфоциты вносят значительный вклад в иммунитет против внутриклеточных патогенов. Это относится и к вирусным инфекциям, где цитотоксические Т-лимфоциты узнают вирусные пептиды, представленные молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I на поверхности инфицированных клеток.⁶⁰ Появление вирус-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов обычно требует активации *in vivo* с помощью инфицирующего вируса. Инактивированные вирусы, также как вирусные белки или пептиды, в большинстве случаев не эффективны *in vivo* для создания иммунного ответа клеточного типа, однако они могут вызывать производство антител против вирусных антигенов.

Отсутствие ожидаемого эффекта после применения пептидов в качестве антигенов может быть отнесено на счет «нефизиологической» формы антигенного представления (нет конъюгата с гликопротеинами главного комплекса гистосовместимости), так как Т_С обычно узнают фрагменты, полученные из белков, эндогенно продуцированных в клетках-мишенях, и не способны узнавать свободные пептиды, не связанные с гликопротеинами главного комплекса гистосовместимости.⁶¹ Второй причиной может являться отсутствие вторичного сигнала, например, цитокинов, освобождаемых антиген-представляющими клетками.

В отличие от нативных пептидов, синтетические пептиды, присоединенные к липофильному якорю (липопептиды), способны активировать вирус-специфичные цитотоксические Т-лимфоциты *in vivo*.⁵⁹ Ниже приведена структура липопептида 56 — эпитопа нуклеопротеина вируса гриппа, наиболее эффективно узнаваемого Н-2d-рестриктазой (пептид NP 147-158(R-)), — конъюгированного с Pam₃Cys-Ser-Ser.

Pam₃Cys-Ser-Ser—Thr-Tyr-Gln-Arg-Thr-Arg-Leu-Val-Thr-Gly

NP 147-158(R-)

56

Точный механизм активации цитотоксических Т-лимфоцитов *in vivo* с помощью липопептидов до сих пор неизвестен. Одной из возможных причин успешной активации липопептидами является тот факт, что якорная молекула Pam₃Cys может активировать вспомогательные клетки, чтобы секретировать факторы, требуемые для дифференциации цитотоксических Т-лимфоцитов.⁵⁹ Если этот факт будет подтвержден, то смесь Pam₃Cys и нативного пептида можно будет использовать для активации цитотоксических Т-лимфоцитов.

Если же эффективность действия липопептидов не связана с неспецифичным действием вспомогательных клеток и/или Т-хелперных клеток, то возможны другие объяснения. Липидный якорь может продлевать период жизни молекулы антигена *in vivo* относительно молекул природных пептидов; не исключено также, что липидный якорь, путем прикрепления к клеточной мембране, позволяет антигену вступить в процесс связывания с гликопротеинами главного комплекса гистосовместимости класса I, что ведет к более «физиологическому» пути антигенного представления.

Основной причиной, ограничивающей использование пептидных вакцин в природных популяциях, является то, что Т-клетки у индивидуумов с различными МНС узнают различные пептиды из вирусных белков всегда вместе с соответствующими собственными МНС. Таким образом, универсальные синтетические вакцины, способствующие созданию популяций для иммунного ответа клеточного типа против данного вируса, должны содержать все эпитопы, узнаваемые Т-клетками. Это требование выполнимо благодаря доступности синтетических Pam₃Cys-Ser-Ser-пептидных конъюгатов. Ковалентно связанный с пептидами Pam₃Cys-Ser-Ser особенно хорошо подходит для разработки вакцин, так как производство нейтрализующих антител — другая важная составляющая противовирусного иммунитета — также может быть достигнуто с помощью конъюгирования Pam₃Cys-Ser-Ser с соответствующими эпитопами.

VIII. Применение липопептидов-2 в борьбе с вирусом иммунодефицита человека

В настоящее время особенно остро стоит проблема заражения человека вирусом иммунодефицита. В последние годы ведутся интенсивные исследования по разработке вакцин против вируса иммунодефицита, способных вызывать производство антител и ассоциированный цитотоксический ответ.

Вакцинация против вируса иммунодефицита человека (HIV) с использованием инактивированных вирусов поднимает вопросы безопасности (подобные процедуры создают ряд проблем в терапии человека). Применение вирусных генов в составе рекомбинантных векторов также нуждается в дальнейших исследованиях. Наиболее перспективной является пептидная вакцинация, однако свободные пептиды обычно малоиммуногенны. В этой связи понятен интерес, проявляемый к использованию липопептидных вакцин. Применение липопептидов не вызывает побочных эффектов, и подобная вакцинация может использоваться для человека. Более того, вызываемый ответ не будет затруднен уже существующим иммунным ответом против вектора, что наблюдается при использовании рекомбинантных вакцин. Ассоциация липопептидов, вызывающих иммунный ответ клеточного типа, с другими липопептидами, способными стимулировать производство антител, должна привести к эффективной защите против вируса иммунодефицита.

Примером использования липопептидов для иммунизации против HIV служит исследование, проведенное авторами работы⁶². Было показано, что С-терминальный сегмент обратной транскриптазы (RT) HIV-1 содержит высокоиммуногенную детерминанту, которая вызывает пролиферацию Т-клеток у различных видов мышей и частично перекры-

вается с эпитопом В-клеток. В качестве адьюванта был использован липопептид *N*-пальмитоил-*S*-[2*R*,*S*-2,3-дипальмитоилоксипропил]-*L*-цистеинил-*D*-серил-*D*-серин, который не обладает токсичностью адьюванта Фрейнда и увеличивает иммуногенность свободных пептидов.⁵²

Чтобы оценить способность липотрипептида Pam₃Cys-Ser-Ser усиливать специфичный к пептидам иммунный ответ *in vivo*, была проведена⁶² иммунизация мышей различных линий (BALB/с, С3Н/HeJ, С57BL/6) с помощью двадцатидвухмерных конъюгатов Pam₃Cys-Ser-Ser-[RT-(522-543)] и Pam₃Cys-Ser-Ser-[RT-(528-549)] обратной транскриптазы HIV-1, которые включают в себя Т-хелперный эпитоп [RT-(528-543)] обратной транскриптазы. Показано, что Pam₃Cys-Ser-Ser представляет собой эффективный адьювант, способный вызвать Т-хелперный и В-клеточный ответы к пептидным последовательностям, представляющим собой фрагменты С-терминальной области обратной транскриптазы HIV-1.

Присоединение липидов или липопептидов к полученным из HIV пептидам с целью получения вакцин против этого вируса описано также в работах^{63,64}. В работе⁶³ использовали С₁₄-жирнокислотный пептид (HDA), а в некоторых экспериментах также С-терминальные части пептидов из V3 области эпитопа нуклеопротеина, соответствующего белкам внешней оболочки HIV-1 (Env), а в работе⁶⁴ синтезировали липопептид Pam₃Cys и модифицировали его с помощью лизинового спейсера четырьмя молекулами Env-пептида HIV-1, получив так называемую мультиплетную антигенную систему (MAPS). Оба продукта были способны вызывать производство антител и цитотоксический ответ к HIV.

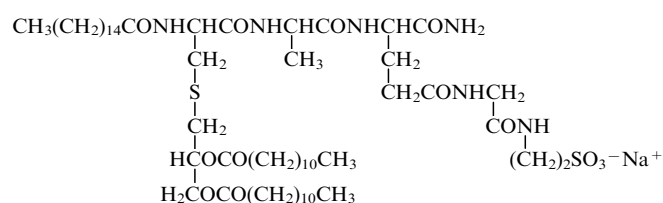
Согласно последним данным, некоторые пептиды узнаются в организмах и мышей, и человека.⁶⁵ Чтобы протестировать эпитоп обратной транскриптазы RT-(528-549) на иммуногенность для Т-лимфоцитов человека, авторы работы⁶² исследовали Т-клеточный ответ HIV-инфицированных людей. Первые результаты цитотоксического ответа к С-терминальной области HIV-1 обратной транскриптазы показали, что липопептид Pam₃Cys-Ser-Ser-[RT-(528-549)] может быть признан цитотоксическими Т-лимфоцитами пациентов, находящихся в различных стадиях заболевания.

Таким образом, наличие эффективного гуморального и Т-клеточного ответа при применении липопептидных конъюгатов, а также отсутствие у них токсичности, делает липопептиды перспективными кандидатами при создании вакцин, используемых для человека.

IX. Противоопухолевая активность липопептидов-2

Другим важным аспектом биологического действия липопептидов, выделенных из клеточной стенки *E. coli*, является противоопухолевая активность.^{66,67}

Модификация пептидного остатка данных липопептидов с помощью таурина привела к ряду соединений (высоко активных *in vivo*), способных вызывать разрушение легочных метастаз. Одним из таких соединений является натриевая соль *N*-гексадеcanoил-*S*-[2*R*-2,3-дидодеканоилоксипропил]-*L*-цистеинил-*L*-аланил-*D*-изоглутамил-глицилтаурина (57, CGP 31362).



57

Синтез соединения 57 аналогичен синтезу соединения 44 и его аналогов (см. схемы 4 и 5). Пептидная часть соединения 57 была модифицирована таурином для придания соединению большей полярности.^{68,69}

Соединение 57 может встраиваться в мембраны фосфолипидных липосом.⁶⁹ Липосомы являются уникальными носителями для доставки биологически активных соединений к фагоцитирующим клеткам *in vivo*. Результатом доставки является активация фагоцитов и, соответственно, разрушение укоренившихся легочных, лимфоидных и печеночных метастаз. Как и другие циркулирующие частицы, липосомы быстро поглощаются фиксированными и свободными фагоцитирующими клетками. Преимущество такой физиологической «гибели» липосом заключается в доставке иммуномодуляторов к клеткам, относящимся к ретикулоэндотелиальной системе.

Соединение 57 в составе липосом способно активировать моноциты крови человека, а также перитонеальные макрофаги и макрофаги костного мозга у мышей.⁷⁰ Систематические инъекции препарата приводили к активации макрофагов *in situ*.⁷¹ При этом макрофаги и фагоцитирующие липосомы, содержащие соединение 57, были способны сохранять противоопухолевую активность в течение нескольких дней, что способствовало устранению укоренившихся раковых метастаз.

Соединение 57 является более эффективным противораковым средством, чем мурамилпептидные производные, так как оно стимулирует противоопухолевую активность при более низких концентрациях и активирует моноциты в отсутствие γ -интерферона. Моноциты, активированные соединением 57, проявляют как активность, связанную с некрозом опухолей, так и активность интерлейкина-1, тогда как моноциты, активированные мурамилпептидами, проявляют только активность, связанную с некрозом опухолей.

На основании многочисленных экспериментов авторы работы⁷¹ делают вывод о том, что соединение 57 способно эффективно активировать макрофаги, осуществляющие лизис опухолевых клеток, причем данное соединение является лучшим активатором моноцитов и макрофагов, чем мурамилпептиды.

X. Заключение

Приведенные в настоящем обзоре данные свидетельствуют о возрастающем интересе исследователей к компонентам бактериальных мембран и, в частности, к липопептидам.

Синтез аналогов бактериальных липопептидов относится к области тонкого органического синтеза сложных конъюгатов. Так, описанная выше методика синтеза соединения 44 и его аналогов, содержащих в своем составе пептидный фрагмент и три остатка жирных кислот, представляет интерес как один из методов синтеза соединений смешанного состава. Разработка таких методов синтеза вносит определенный вклад в развитие синтетической органической химии.

Так как липопептиды являются оптически активными соединениями, то их синтез сопряжен с целым рядом проблем, связанных с получением оптически чистых соединений. На сегодняшний день синтез большинства липопептидов отличается сложностью и многостадийностью процесса. Это препятствует получению широкого набора модифицированных аналогов природных соединений, необходимых для исследовательских целей.

Изучение биологической активности липопептидов, являющихся компонентами бактериальных мембран, позволяет расширить наши представления как о структурной организации мембран, так и об активности соединений смешанного состава в борьбе с инфекциями.

Для природных липопептидов и их синтетических аналогов продемонстрированы различные фармакологические эффекты *in vivo*. Кроме иммуномодулирующих свойств

липопептиды обладают также противоопухолевой активностью, а в последние годы широко используются при борьбе с вирусом иммунодефицита человека.

Так как липопептиды не обладают токсическими свойствами, то можно предположить, что соединения этого класса найдут широкое применение при создании современных синтетических вакцин, а также при лечении злокачественных опухолей и болезней, связанных с аутоиммунными реакциями.

Литература

1. В кн. *Химическая энциклопедия*. Т.2. Советская энциклопедия, Москва, 1990, С.1195
2. A.Adam, R.Ciorbaru, J.-F.Petit, E.Lederer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 851 (1972)
3. F.Ellouz, A.Adam, R.Ciorbaru, E.Lederer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 1317 (1974)
4. S.Kotani, Y.Watanabe, F.Kinoshita, T.Shimono, I.Morisaki, T.Shiba, S.Kusumoto, Y.Tarumia, K.Ikenaka. *Biken J.*, **18**, 105 (1975)
5. P.Lefrancier, J.Choay, M.Derrien, I.Lederman. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **9**, 249 (1977)
6. C.Merser, P.Sinay, A.Adam. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1316 (1975)
7. P.Lefrancier, E.Lederer. *Chemistry of Synthetic Immunomodulant Muramyl Peptides*. Springer-Verlag, New York, 1981
8. G.H.Werner, F.Floch, D.Migliore-Samour, P.Golles. *Experientia*, **42**, 521 (1986)
9. I.Azuma, G.Golles. *Immunostimulants Now and Tomorrow*. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, 1987
10. Г.Шлегель. *Общая микробиология*. Мир, Москва, 1987
11. G.Baschang. *Tetrahedron*, **45**, 6331 (1989)
12. V.Braun. *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 335 (1975)
13. H.C.Wu, M.Tokunaga. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.*, **125**, 127 (1986)
14. R.Maget-Dana, F.Peypoux. *Toxicology*, **87**, 151 (1994)
15. K.Yoshio, M.Sugiyama, M.Kaneda. *J. Antibiot.*, **48**, 1095 (1995)
16. J.P.Devlin, K.D.Hargrave. *Tetrahedron*, **45**, 4327 (1989)
17. Б.Альбертс, Д.Брей, Дж.Льюис, М.Рэфф, К.Робертс, Дж.Уотсон. *Молекулярная биология клетки*. Т.3. Мир, Москва, 1994. С.177; 186; 218
18. D.Migliore-Samour, J.Bouchaudon, F.Floch, A.Zerial, L.Ninet, G.H.Werner, P.Golles. *Life Sci.*, **26**, 883 (1980)
19. D.Migliore-Samour, J.Bouchaudon, F.Floch, A.Zerial, L.Ninet, G.H.Werner, P.Golles. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D*, **289**, 473 (1979)
20. G.H.Werner, F.Floch, J.Bouchaudon, A.Zerial, D.Migliore-Samour, P.Golles. In *Current Concepts in Human Immunology and Cancer Immunomodulation*, Vol. 17, 1982. P. 645
21. F.Floch, J.Bouchaudon, G.H.Werner. *Drugs Future*, **9**, 763 (1984)
22. F.Floch, J.Poirier. *Int. J. Pharm.*, **10**, 863 (1988)
23. F.Floch, J.Poirier. In *Proceedings of the 6th International Congress of Immunology*. Toronto, Canada, 1986. 65-41.25.
24. M.A.Parant, F.M.Audibert, L.A.Chedid, M.R.Level, P.L.Lefraucier, J.P.Choay, E.Lederer. *Infect. Immunol.*, **27**, 826 (1980)
25. K.Hemmi, H.Takeno, S.Okada, O.Nakaguchi, Y.Kitaura, M.Hashimoto. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 7026 (1981)
26. H.Takeno, S.Okada, S.Yonishi, K.Hemmi, O.Nakaguchi, Y.Kitaura, M.Hashimoto. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2932 (1984)
27. S.Izumi, K.Nakahara, T.Gotoh, S.Hashimoto, T.Kino, M.Okuhara, H.Aoki, H.Imanaka. *J. Antibiot.*, **36**, 566 (1983)
28. H.Takeno, S.Okada, K.Hemmi, M.Aratani, Y.Kitaura, M.Hashimoto. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2925 (1984)
29. H.Schneider, G.Sigmund, B.Schricker, K.Thirring, H.Berner. *J. Org. Chem.*, **58**, 683 (1993)
30. A.Frauer, M.Mehlführer, K.Thirring, H.Berner. *J. Org. Chem.*, **59**, 4215 (1994)
31. Y.Mine, Y.Yokota, Y.Wakai, S.Fukuda, M.Nishida, S.Goto, S.Kuwahara. *J. Antibiot.*, **36**, 1045 (1983)
32. K.Masek, J.Seifert, M.Flegel, M.Krojidló, J.Kolinsky. *Methods Find. Exp. Clin. Pharm.*, **6**, 667 (1984)
33. D.Migliore-Samour, M.Delaforge, M.Jaouen, D.Mansuy, P.Golles. *Experientia*, **45**, 882 (1989)
34. S.I.Shedlofsky, A.T.Swim, J.M.Robinson, V.S.Gallicchio, D.A.Cohen, C.J.Mc.Clain. *Life Sci.*, **40**, 2331 (1987)
35. T.C.Peterson, K.W.Renton. *Immunopharmacology*, **11**, 21 (1986)
36. T.C.Peterson, K.W.Renton. *Biochem. Pharm.*, **35**, 1491 (1986)
37. F.Melchers, V.Braun, C.Galanos. *J. Exp. Med.*, **142**, 473 (1975)
38. W.G.Bessler, V.Braun. *Z. Immunitätsforsch.*, **150**, 193 (1975)
39. W.G.Bessler, K.Resch, E.Hancock, K.Hantke. *Z. Immunitätsforsch.*, **153**, 11 (1977)
40. W.G.Bessler, M.Cox, A.Lex, B.Suhr, K.-H.Wiesmüller, G.Jung. *J. Immunol.*, **135**, 1353 (1985)
41. G.Jung. In *Proceeding of the 1-st International Conference on Synthetic Antigens*. Ann. Sclavo, Siena, 1984. P.191
42. W.Prass, H.Ringsdorf, W.Bessler, K.-H.Wiesmüller, G.Jung. *Biochim. Biophys. Acta*, **900**, 116 (1987)
43. G.Jung, K.-H.Wiesmüller, G.Becker, H.-J.Bühning, W.G.Bessler. *Angew. Chem.*, **97**, 883 (1985)
44. W.G.Bessler, B.Suhr, H.-J.Büchring, C.P.Müller, K.-H.Wiesmüller, G.Becker, G.Jung. *Immunobiology*, **170**, 239 (1985)
45. K.-H.Wiesmüller, W.G.Bessler, G.Jung. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **364**, 593 (1983)
46. W.G.Bessler, R.B.Johnson, K.-H.Wiesmüller, G.Jung. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **363**, 767 (1982)
47. K.Hantke, V.Braun. *Eur. J. Biochem.*, **34**, 284 (1973)
48. W.G.Bessler, B.P.Ottenbreit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 239 (1976)
49. A.Reitermann, J.Metzger, K.-H.Wiesmüller, G.Jung, W.G.Bessler. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **370**, 343 (1989)
50. R.B.Johnson, S.Kohl, K.-H.Wiesmüller, W.G.Bessler. *Immunobiology*, **165**, 27 (1983)
51. L.Biesert, W.Scheurer, W.G.Bessler. *Eur. J. Biochem.*, **162**, 651 (1987)
52. J.Metzger, K.-H.Wiesmüller, R.Schaude, W.G.Bessler, G.Jung. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **37**, 46 (1991)
53. E.Jacques, A.Grob. *Tetrahedron*, **50**, 6271 (1994)
54. B.Kleine, W.Rapp, K.-H.Wiesmüller, M.Edinger, W.Beck, J.Metzger, R.Ataulakhanov, G.Jung, W.G. Bessler. *Immunobiology*, **190**, 53 (1994)
55. K.Deres, H.Schild, K.-H.Wiesmüller, G.Jung, H.G.Rammensee. *Eur. J. Immunol.*, **21**, 2649 (1991)
56. A.Lex, K.-H.Wiesmüller, G.Jung, W.G.Bessler. *J. Immunol.*, **137**, 1421 (1986)
57. R.Hunter, M.Olsen, S.Buynitzky. *Vaccine*, **9**, 250 (1991)
58. A.G.Beck-Sickinger, H.Rotering, K.-H.Wiesmüller, F.Dorner, G.Jung. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **375**, 173 (1994)
59. K.Deres, H.Schild, K.-H.Wiesmüller, G. Jung, H.G.Rammensee. *Nature (London)*, **342**, 561 (1989)
60. R.M.Zinkernagel, P.C.Doherty. *Adv. Immunol.*, **27**, 51 (1979)
61. A.R.Townsend. *Immunol. Res.*, **6**, 80 (1987)
62. M.Loleit, H.G.Ihlenfeldt, J.Brunjes, G.Jung, B.Müller, P.Hoffmann, W.G.Bessler, M.Pierres, G.Haas. *Immunobiology*, **195**, 61 (1996)
63. F.Martinon, H.Gras-Masse, C.Boutillon, E.Gomard, B.Deprez, A.Tartar, J.P.Levi. *J. Immunol.*, **149**, 3416 (1992)
64. I.P.Defoort, B.Nardelli, W.Huang, D.D.Ho, J.P.Tam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3879 (1992)
65. A.M.Hosmalin, B.Clerici, Houghten, C.D.Pendelton, S.Flexner, D.Cucey, B.Moss, R.N.Germain, G.M.Shearer, J.A.Berzofsky. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2344 (1990)
66. Пат. Швейцария, 20 июня (1977)
67. Пат. Швейцария, 25 января (1983)
68. Пат. 4 666 886A США; *Chem. Abstr.*, **108**, 38434f (1987)
69. I.J.Fidler, A.Nii, T.Utsugi, D.Brown, O.Bakouche, E.S.Kleinerman. *Lymphokine Res.*, **9**, 449 (1990)
70. D.Zhongyun, X.Qi, I.J.Fidler. *J. Exp. Med.*, **177**, 1071 (1993)
71. T.Utsugi, A.Nii, D.Fan, C.C.Pak, Y.Denkins, P. van Hoogevest, I.J.Fidler. *Cancer Immunol. Immunother.*, **33**, 285 (1991)

STRUCTURE, SYNTHESIS AND IMMUNOMODULATING ACTIVITY OF BACTERIAL LIPO-PEPTIDES AND THEIR ANALOGUES

M.P.Ousanova, Y.L.Sebyakin

M.V.Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology,

86, Prosp. Vernadskogo, 117571 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)430–7983

The current state and prospects for the application of natural lipopeptides and their analogs in studying of function mechanisms of complex biological systems and for their use in biochemistry and medicine are considered. The results of the studies on their synthesis and investigation of their biological activity are summarized. The data on the application of lipopeptides as components of the synthetic vaccines and antitumour agents are reviewed.

Bibliography — 71 references.

Received 4th December 1996